

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

16. 4. 2004

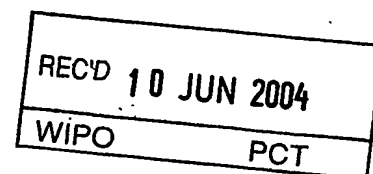
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 1 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 1 4 5 7 9
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 1 4 5 7 9]

出 願 人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

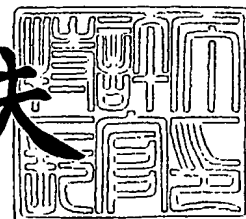


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 5 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 H15-0071A4

【提出日】 平成15年 4月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 35/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 森下 剛

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 桜田 一洋

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 鈴木 恵子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会
社 東京研究所内

【氏名】 池田 俊一

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経再生薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3（以下、GSK-3 と略す）の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬。

【請求項 2】 神経再生薬が、神経疾患の治療薬である請求項 1 記載の医薬。

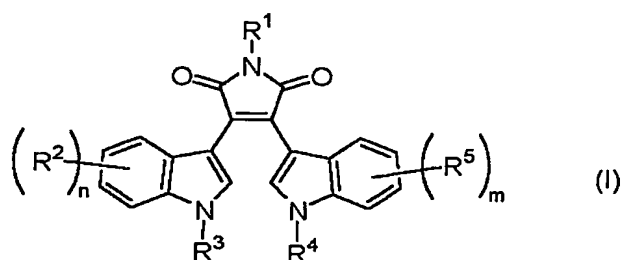
【請求項 3】 神経疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳血管障害、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、うつ病および躁鬱病からなる群より選ばれる神経疾患である請求項 2 記載の医薬。

【請求項 4】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 5】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体もしくはインドロカルバゾール誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 6】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(I)

【化 1】



[式中、nおよびmは同一または異なって、1～3の整数を表し、

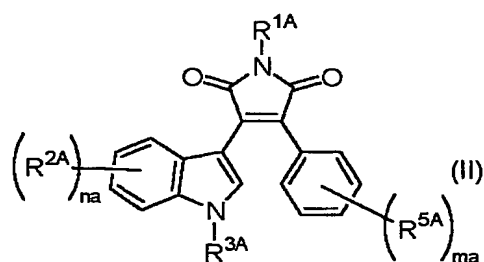
R¹、R³およびR⁴は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶（式中、R⁶は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）、-COOR⁷（式中、R⁷は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）ま

たは-OR⁸ (式中、R⁸は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す)を表し、

R²およびR⁵は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

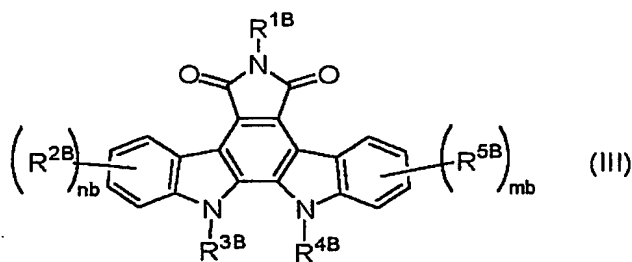
nおよびmがそれぞれ2または3であるとき、それぞれのR²およびR⁵は同一でも異なってもよい]で表される化合物、式(II)

【化2】



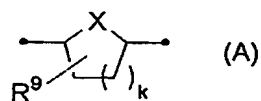
(式中、na、ma、R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}およびR^{5A}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²、R³およびR⁵と同義である)で表される化合物もしくは式(III)

【化3】



[式中、nb、mb、R^{1B}、R^{2B}およびR^{5B}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²およびR⁵と同義であり、R^{3B}およびR^{4B}は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶ (式中、R⁶は前記と同義である)、-COOR⁷ (式中、R⁷は前記と同義である) または-OR⁸ (式中、R⁸は前記と同義である)を表すか、またはR^{3B}とR^{4B}が一緒になって、

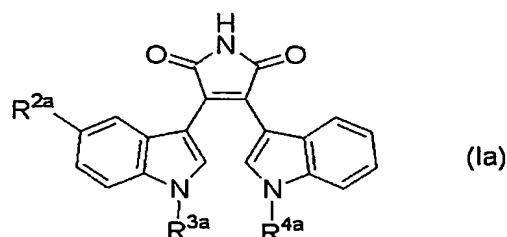
【化 4】



(式中、kは1または2を表し、XはCH₂、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、R⁹はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコシカルボニルを表す)を形成する]で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項7】 GSK-3の活性を阻害する物質が、式(Ia)

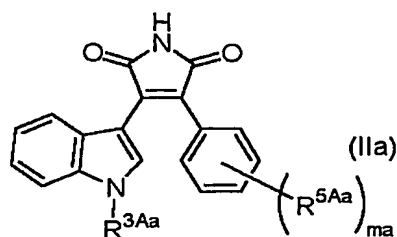
【化 5】



(式中、R^{2a}は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、R^{3a}およびR^{4a}は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項6記載の医薬。

【請求項8】 GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIa)

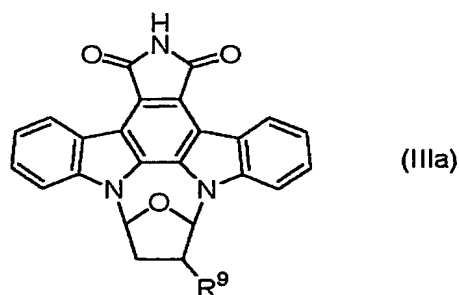
【化 6】



(式中、maは前記と同義であり、R^{3Aa}は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、R^{5Aa}はハロゲンを表す)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項6記載の医薬。

【請求項 9】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(IIIa)

【化 7】



(式中、R⁹は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項 6 記載の医薬。

【請求項 10】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、

3, 4-ビス (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- (1-プロピルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-シアノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルボキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルバモイルプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

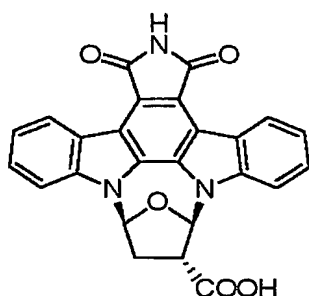
3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンおよび

【化8】



からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項6記載の医薬。

【請求項11】 GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤。

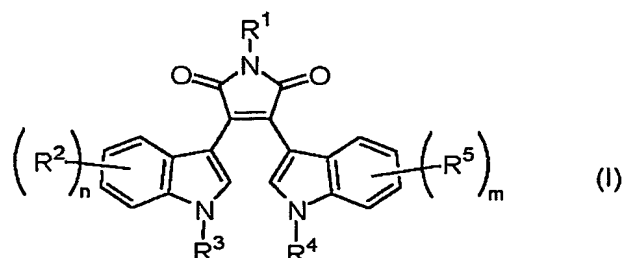
【請求項12】 GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬

理学的に許容される塩である請求項 11 記載のニューロン新生促進剤。

【請求項 13】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体もしくはインドロカルバゾール誘導体またはそれらの薬理的に許容される塩である請求項 11 記載のニューロン新生促進剤。

【請求項 14】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(I)

【化 9】



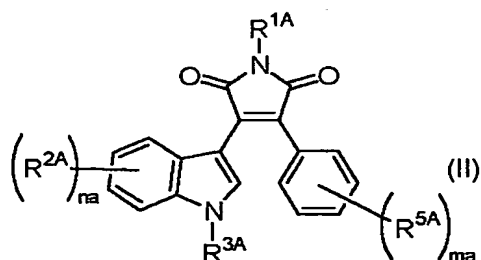
[式中、nおよびmは同一または異なって、1~3の整数を表し、

R¹、R³およびR⁴は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶ (式中、R⁶は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す)、-COOR⁷ (式中、R⁷は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) または-OR⁸ (式中、R⁸は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す) を表し、

R²およびR⁵は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

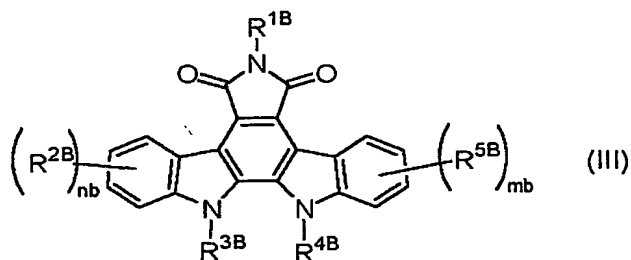
nおよびmがそれぞれ2または3であるとき、それぞれのR²およびR⁵は同一でも異なってもよい] で表される化合物、式(II)

【化 10】



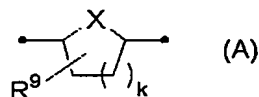
(式中、na、ma、R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}およびR^{5A}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²、R³およびR⁵と同義である) で表される化合物もしくは式(III)

【化 11】



[式中、nb、mb、R^{1B}、R^{2B}およびR^{5B}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²およびR⁵と同義であり、R^{3B}およびR^{4B}は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶ (式中、R⁶は前記と同義である)、-COOR⁷ (式中、R⁷は前記と同義である) または-OR⁸ (式中、R⁸は前記と同義である) を表すか、またはR^{3B}とR^{4B}が一緒になって、

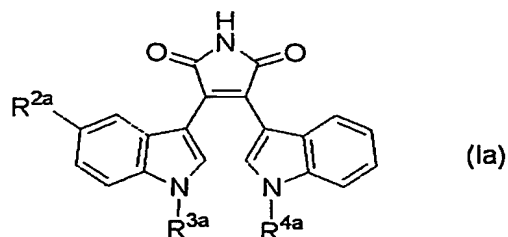
【化 12】



(式中、kは1または2を表し、XはCH₂、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、R⁹はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す) を形成する] で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である請求項 11 記載のニューロン新生促進剤。

【請求項 15】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(Ia)

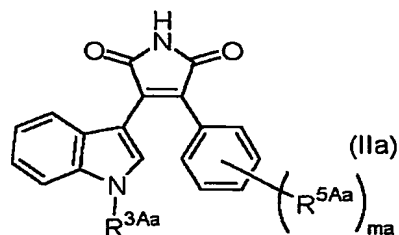
【化 1 3】



(式中、 R^{2a} は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、アリー
ルまたはニトロを表し、 R^{3a} および R^{4a} は同一または異なって、置換もしくは非置
換の低級アルキルを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩
である請求項 14 記載のニューロン新生促進剤。

【請求項 16】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(IIa)

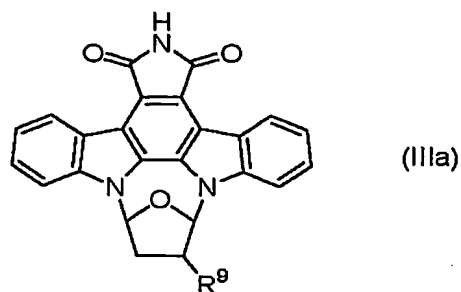
【化 1 4】



(式中、 ma は前記と同義であり、 R^{3Aa} は置換もしくは非置換の低級アルキルを表
し、 R^{5Aa} はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される
塩である請求項 14 記載のニューロン新生促進剤。

【請求項 17】 GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(IIIa)

【化 1 5】



(式中、 R^9 は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容さ

れる塩である請求項14記載のニューロン新生促進剤。

【請求項18】 GSK-3の活性を阻害する物質が、

3, 4-ビス (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- (1-プロピルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-シアノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルボキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルバモイルプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- [1- (3-ヒドロキシプロピル) -5-ニトロインドール-3-イル] -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

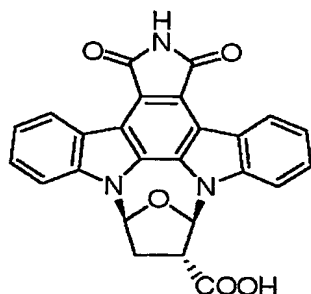
3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンおよび

【化16】



からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である請求項14記載のニューロン新生促進剤。

【請求項19】 請求項11～18のいずれか1項に記載のニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン。

【請求項20】 請求項11～18のいずれか1項に記載のニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養してニューロンを新生させ、培養物中よりニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（以下、GSK-3と略す）の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなるニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン、および

該ニューロンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

神経疾患とは、脳や末梢のニューロンが遺伝的要因、環境要因、加齢要因などにより傷害を受ける疾患である神経変性疾患と、神経の変性を伴わないうつ病および躁鬱病等とを総称する。神経変性疾患として、具体的には、パーキンソン病、アルツハイマー病、ポリグルタミン酸病、筋萎縮性側索硬化症、多発ニューロパチー、脊髄損傷、脳血管障害などがあげられる。これら神経変性疾患の一般的治療法は、ニューロンの傷害により失われた神経伝達物質を補充する療法であるが、該療法で症状が改善するのはパーキンソン病、アルツハイマー病などに限定される。また神経伝達物質補充療法では神経細胞死の進行を止めることはできない。

【0003】

中枢神経系を再生する再生医療は、パーキンソン病で失われたドーパミン作動性ニューロンの機能を積極的に回復させる治療法として検討が進められてきたが、中絶胎児脳を用いる方法であることから様々な問題があり一般的な利用としては応用されていない。

また、胎児脳から取得した神経幹細胞やヒト受精卵から取得したES細胞を生体外で大量培養した後、目的のニューロンへ変換して移植に用いるという治療法も検討されているが、目的とするニューロンへ正確に分化させる技術は確立しておらず、また胎児由来の神経幹細胞やヒトES細胞を用いる方法であることに起因する問題もあり、臨床応用は進んでいない。

【0004】

一方、成体脳から神経幹細胞が分離され、ヒト成体脳でも生涯にわたりニューロンの新生が起こることが報告されたことから、患者の脳内に内在する神経幹細胞を薬剤などで刺激して再生を誘導して神経変性疾患を治療する方法が検討されている。

インスリン様増殖因子-1（非特許文献1）、線維芽細胞増殖因子-2（非特許文献2）、ステムセルファクター（非特許文献3）、エリスロポエチン（非特

許文献4)、全能虚血(非特許文献5)、てんかん刺激(非特許文献6)などサイトカインの脳内投与や疾患モデルにより海馬や嗅球でのニューロン新生が促進できることが報告されている。また、腫瘍増殖因子 α の脳内投与により線条体でドーパミン作動性ニューロンが新生し、パーキンソン病の症状から回復することも報告されている(非特許文献7)。さらに、海馬への虚血傷害により失われたCA1錐体細胞が虚血後2日目から5日目にかけて脳内に線維芽細胞増殖因子-2と上皮細胞増殖因子を投与することにより、その40%が完全に回復することも報告されている(非特許文献8)。

【0005】

しかし、上記の方法は、いずれも蛋白性の因子を脳内に投与することが必要であり、一般的な医療へと応用することは困難である。

末梢投与可能な低分子化合物によりニューロン新生を惹起できるものとしては、モノアミンオキシダーゼ阻害剤、セロトニン特異的なトランスポーター阻害剤、フォスフォジエステラーゼIV阻害剤などの抗鬱薬が報告されている(非特許文献9)。これらの薬剤が脳内で神経再生を誘導するメカニズムとしては、セロトニン作動性ニューロンのセロトニン受容体シグナルに直接あるいは間接的に作用して、神経栄養因子を生産し、セロトニン作動性ニューロン周囲のニューロン新生を促進していることが考えられている。したがって、これらの薬剤はセロトニン作動性ニューロンの変性とは関係しない大部分の神経疾患においては、神経再生薬として利用することはできないと考えられる。

【0006】

また、気分安定化薬のリチウムが細胞死抑制遺伝子bcl-2の発現を誘導することにより海馬で恒常的に新生している新生ニューロンをニューロン死から保護し、海馬でのニューロン新生を見かけ上増加させることが報告されている(非特許文献10)。またリチウムは神経栄養因子BDNFの発現を誘導することも報告されている(非特許文献11)。しかしながら、リチウムが直接、神経幹細胞に働きかけ、ニューロン分化を促進することによりニューロン新生を促進させることについては報告されておらず、またリチウムの海馬以外でのニューロン新生促進活性についても報告されていない。また、リチウムが何故、神経変性を伴わない

つ病および躁鬱病に対し治療効果があるのかについても知られていない。

【0007】

アルツハイマー病では、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3（以下、GSK-3と略す）が、微小管関連蛋白質であるタウ蛋白質を過剰にリン酸化することで神経原繊維変化を形成し、神経細胞死を誘導するという仮説が提唱されている（非特許文献11）。またGSK-3の活性を阻害する物質は、in vitroにおいて成熟した神経細胞を保護する活性があると報告されている（非特許文献12）。該報告に基づき、GSK-3の活性を阻害する物質は、アルツハイマー病をはじめ様々な神経変性疾患の治療薬として用いることができると考えられている（特許文献1）が、成熟したニューロンを保護することで実際に神経変性疾患を治療することができるか否か、およびGSK-3の活性を阻害する物質にニューロン新生促進作用があることは知られていない。

【0008】

【非特許文献1】

J. Neuroscience, 20, 2896-2903(2000)

【0009】

【非特許文献2】

Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 98, 5874-5879(2001)

【0010】

【非特許文献3】

J. Clin. Invest., 110, 311-319(2002)

【0011】

【非特許文献4】

J. Neuroscience, 21, 9733-9743(2001)

【0012】

【非特許文献5】

J. Neuroscience, 18, 7768-7778(1998)

【0013】

【非特許文献6】

J. Neuroscience, 22, 3174-3188(2002)

【0 0 1 4】

【非特許文献 7】

Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 97, 14686-14691(2000)

【0 0 1 5】

【非特許文献 8】

Cell, 110, 429-441(2002)

【0 0 1 6】

【非特許文献 9】

Neuropsychopharmacology, 25, 836-844(2001)

【0 0 1 7】

【非特許文献 1 0】

J. Neurochemistry, 75, 1729-1734(2000)

【0 0 1 8】

【非特許文献 1 1】

Neuropharmacology, 43, 1173-1179(2002)

【0 0 1 9】

【非特許文献 1 2】

Trends in Molecular Medicine, 8, 126-132(2002)

【0 0 2 0】

【非特許文献 1 3】

J. Neurochemistry, 77, 94-102(2001)

【0 0 2 1】

【特許文献 1】

国際公開第 0 0 / 3 8 6 7 5 号パンフレット

【0 0 2 2】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、G S K - 3 の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、該物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン

新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供することにある。

【0023】

【課題を解決するための手段】

本発明は以下の(1)～(20)に関する。

(1) グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (以下、GSK-3 と略す) の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬。

(2) 神経再生薬が、神経疾患の治療薬である上記(1)の医薬。

【0024】

(3) 神経疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳血管障害、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、うつ病および躁鬱病からなる群より選ばれる神経疾患である上記(2)の医薬。

(4) GSK-3 の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

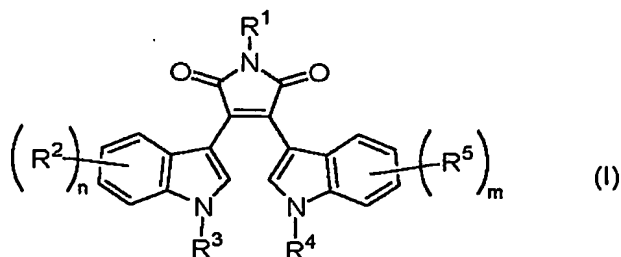
【0025】

(5) GSK-3 の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体もしくはインドロカルバゾール誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記(1)～(3)のいずれか1つの医薬。

(6) GSK-3 の活性を阻害する物質が、式(I)

【0026】

【化17】



【0027】

[式中、nおよびmは同一または異なって、1～3の整数を表し、

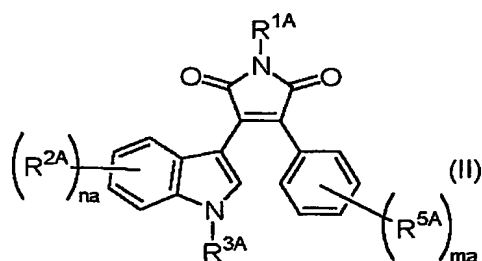
R^1 、 R^3 および R^4 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-\text{COR}^6$ （式中、 R^6 は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）、 $-\text{COOR}^7$ （式中、 R^7 は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）または $-\text{OR}^8$ （式中、 R^8 は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）を表し、

R^2 および R^5 は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

n および m がそれぞれ2または3であるとき、それぞれの R^2 および R^5 は同一でも異なってもよい] で表される化合物、式(II)

【0028】

【化18】

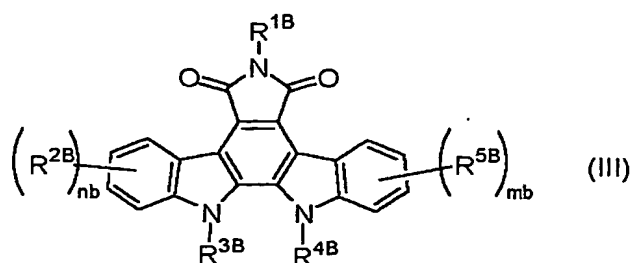


【0029】

（式中、 na 、 ma 、 R^{1A} 、 R^{2A} 、 R^{3A} および R^{5A} は、それぞれ前記 n 、 m 、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^5 と同義である）で表される化合物もしくは式(III)

【0030】

【化19】

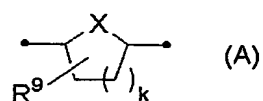


【0031】

〔式中、nb、mb、 R^{1B} 、 R^{2B} および R^{5B} は、それぞれ前記n、m、 R^1 、 R^2 および R^5 と同義であり、 R^{3B} および R^{4B} は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、 $-COR^6$ （式中、 R^6 は前記と同義である）、 $-COOR^7$ （式中、 R^7 は前記と同義である）または $-OR^8$ （式中、 R^8 は前記と同義である）を表すか、または R^{3B} と R^{4B} が一緒になって、

【0032】

【化20】



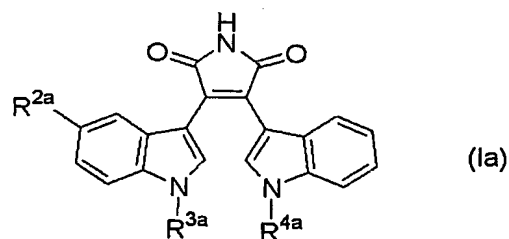
【0033】

〔式中、kは1または2を表し、Xは CH_2 、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、 R^9 はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコキシカルボニルを表す〕を形成する〕で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記（1）～（3）のいずれか1つの医薬。

（7） GSK-3の活性を阻害する物質が、式(Ia)

【0034】

【化21】



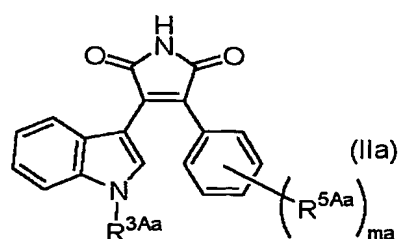
【0035】

(式中、 R^{2a} は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、アリアルまたはニトロを表し、 R^{3a} および R^{4a} は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(6)の医薬。

(8) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIa)

【0036】

【化22】



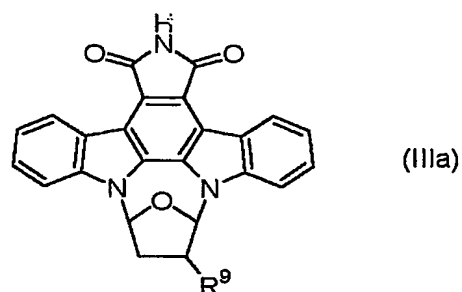
【0037】

(式中、 ma は前記と同義であり、 R^{3Aa} は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 R^{5Aa} はハロゲンを表す) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(6)の医薬。

(9) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIIa)

【0038】

【化23】



【0039】

(式中、 R^9 は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(6)の医薬。

(10) GSK-3の活性を阻害する物質が、

3, 4-ビス (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- (1-プロピルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-シアノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルボキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-カルバモイルプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-アミノプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- [1- (3-ヒドロキシプロピル) インドール-3-イル] -4- (1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル) -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (1-メチルインドール-3-イル) -4- [1- (3-ヒドロキシプロピル) -5-ニトロインドール-3-イル] -1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3- (2-クロロフェニル) -4- (1-メチルインドール-3-イル) -1H

ーピロール-2, 5-ジオン、

3-(2, 4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)

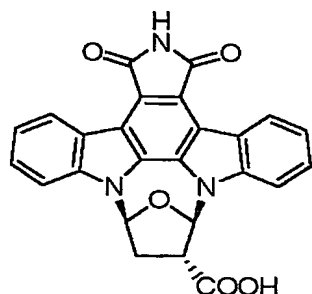
-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2, 5-ジオンおよび

【0040】

【化24】



【0041】

からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(6)の医薬。

(11) GSK-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤。

(12) GSK-3の活性を阻害する物質が、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩である上記(11)のニューロン新生促進剤。

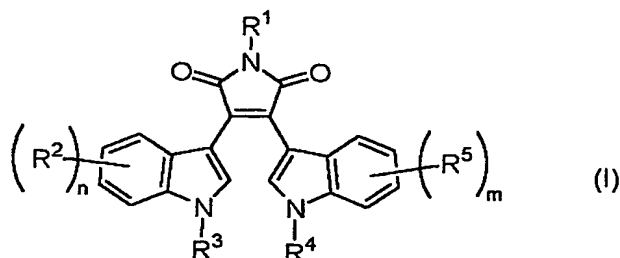
【0042】

(13) GSK-3の活性を阻害する物質が、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体もしくはインドロカルバゾール誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記(11)のニューロン新生促進剤。

(14) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(I)

【0043】

【化 25】



【0044】

[式中、nおよびmは同一または異なって、1～3の整数を表し、

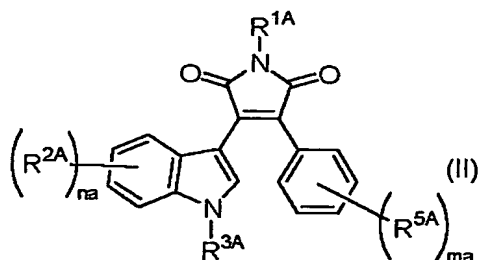
R¹、R³およびR⁴は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶（式中、R⁶は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）、-COOR⁷（式中、R⁷は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）または-OR⁸（式中、R⁸は水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のシクロアルキルを表す）を表し、

R²およびR⁵は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシ、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリール、カルボキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、アミノまたはモノもしくはジ低級アルキルアミノを表し、

nおよびmがそれぞれ2または3であるとき、それぞれのR²およびR⁵は同一でも異なっているてもよい] で表される化合物、式(II)

【0045】

【化 26】

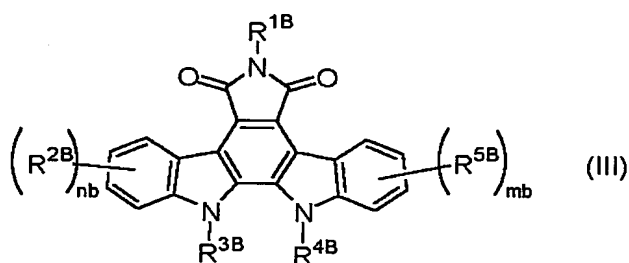


【0046】

(式中、na、ma、R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}およびR^{5A}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²、R³およびR⁵と同義である) で表される化合物もしくは式(III)

【0047】

【化 27】

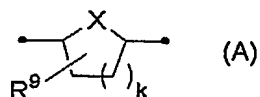


【0048】

[式中、nb、mb、R^{1B}、R^{2B}およびR^{5B}は、それぞれ前記n、m、R¹、R²およびR⁵と同義であり、R^{3B}およびR^{4B}は同一または異なって、水素原子、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、-COR⁶ (式中、R⁶は前記と同義である)、-COOR⁷ (式中、R⁷は前記と同義である) または-OR⁸ (式中、R⁸は前記と同義である) を表すか、またはR^{3B}とR^{4B}が一緒になって、

【0049】

【化 28】



【0050】

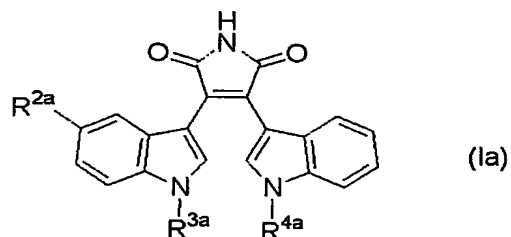
(式中、kは1または2を表し、XはCH₂、NH、酸素原子または硫黄原子を表し、R⁹

はヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイルまたは低級アルコシカルボニルを表す)を形成する]で表される化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩である上記(11)のニューロン新生促進剤。

(15) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(Ia)

【0051】

【化29】



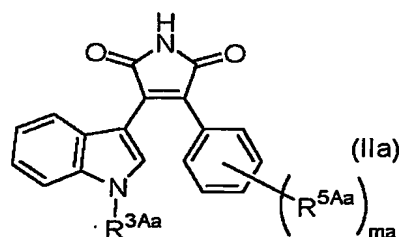
【0052】

(式中、R^{2a}は水素原子、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、アリールまたはニトロを表し、R^{3a}およびR^{4a}は同一または異なって、置換もしくは非置換の低級アルキルを表す)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(14)の神経細胞新生促進剤。

(16) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIa)

【0053】

【化30】



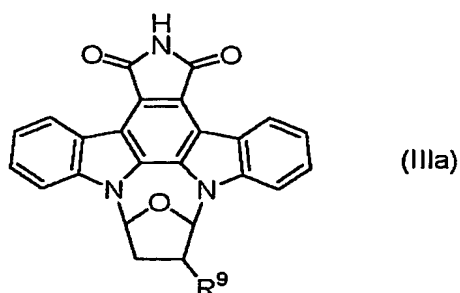
【0054】

(式中、maは前記と同義であり、R^{3Aa}は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、R^{5Aa}はハロゲンを表す)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(14)のニューロン新生促進剤。

(17) GSK-3の活性を阻害する物質が、式(IIIa)

【0055】

【化31】



【0056】

(式中、 R^9 は前記と同義である) で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記(14)のニューロン新生促進剤。

(18) GSK-3の活性を阻害する物質が、

3, 4-ビス(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-(1-プロピルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-シアノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-カルボキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-カルバモイルプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン、

3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2, 5-ジオン

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
 3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

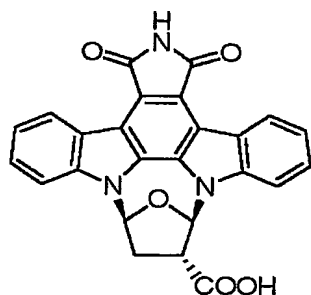
3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

4-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-3-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンおよび

【0057】

【化32】



【0058】

からなる群より選ばれる化合物またはその薬理学的に許容される塩である上記（14）のニューロン新生促進剤。

(19) 上記(10)～(18)のいずれか1つのニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン。

(20) 上記(10)～(18)のいずれか1つのニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養してニューロンを新生させ、培養物中よりニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造方法。

【0059】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の詳細を説明する。

1. 本発明の神経再生薬および神経幹細胞のニューロン新生促進剤に含有される GSK-3 の活性を阻害する物質

GSK-3 の活性を阻害する物質としては、GSK-3 の活性を阻害する化合物であればいずれでもよいが、例えばリチウム、ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体等があげられる。ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体としては、具体的には、例えば式(I)～(III)で表される化合物があげられる。中でも3,4-ビス(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-(1-プロピルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-[1-(3-シアノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-[1-(3-カルボキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-[1-(3-カルバモイルプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-プロピルオキシインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン

ン、

3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン

、

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-フェニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-メトキシカルボニルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-4-(1-メチル-5-ニトロインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(1-メチルインドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-5-ニトロインドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

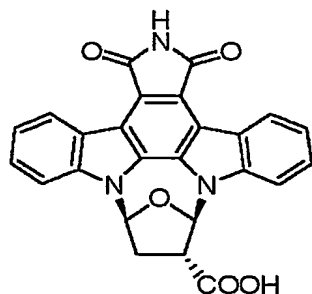
3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)インドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

3-[1-(3-アミノプロピル)インドール-3-イル]-4-(2-クロロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンおよび

【0060】

【化33】



【0061】

等が好ましい。

以下、式 (I) ~ (III) で表される化合物をそれぞれ化合物 (I) ~ (III) という。他の式番号の化合物についても同様である。

化合物 (I) ~ (III) および化合物 (Ia) ~ (IIIa) の各基の定義において、以下の例示があげられる。

(i) 低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコシカルボニルの低級アルキル部分としては、例えば直鎖または分岐状の炭素数1~10のアルキルがあげられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、6-メチルヘプチル、イソオクチル、ノニル、デシル等があげられる。

(ii) シクロアルキルとしては、例えば炭素数3~8のシクロアルキルがあげられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等があげられる。

(iii) 低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数2~8のアルケニルがあげられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2, 6-オクタジエニル等があげられる。

(iv) モノもしくはジ低級アルキルアミノの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、ジ低級アルキルアミノの2つの低級アルキル部分は、同一でも異なってもよい。

(v) ハロゲンとは、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。

(vi) アリールとしては、例えば炭素数6~14の単環式、二環式または三環式のアリールがあげられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等があげられる。

(vii) 置換低級アルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルコキシおよび置換低級アルコシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数1~3の、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、カルバ

モイル、アミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノ、シクロアルキル、低級アルカノイル、低級アルコキシ、アリール、置換アリール、アリールオキシ、置換アリールオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルカノイルオキシ等があげられる。

【0062】

ここで示したハロゲン、モノもしくはジ低級アルキルアミノ、シクロアルキル、アリールおよびアリールオキシのアリール部分、ならびに低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルカノイルおよび低級アルカノイルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)、モノまたはジ低級アルキルアミノ(iv)、シクロアルキル(ii)、アリール(vi)および低級アルキル(i)と同義である。

【0063】

また、ここで示した置換アリールおよび置換アリールオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数1~3の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等があげられる。

ここで示したハロゲンならびに低級アルキル、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)および低級アルキル(i)と同義である。

(viii)置換アリールおよび置換シクロアルキルにおける置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(vii)の定義であげた基に加え、例えば低級アルキル、置換低級アルキル等があげられる。

【0064】

ここで示した置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換数1~3の、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等があげられる。

ここで示したハロゲンならびに低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は、それぞれ前記ハロゲン(v)および低級アルキル(i)と同義である。。

【0065】

また、ここで示した低級アルキルは、前記低級アルキル(i)と同義である。

ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、化合物(I)～(III)および化合物(Ia)～(IIIa)の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩などの有機酸塩があげられ、薬理学的に許容される金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩などがあげられ、薬理学的に許容されるアンモニウム塩としては、アンモニウム、テトラメチルアンモニウムなどの塩があげられ、薬理学的に許容される有機アミン付加塩としては、モルホリン、ピペリジンなどの付加塩等があげられる。

【0066】

ビスインドリルマレイミド誘導体、3-アリール-4-インドリルマレイミド誘導体、インドロカルバゾール誘導体、化合物(I)～(III)および化合物(Ia)～(IIIa)は、EP 470490、WO 93/18766、WO 93/18765、EP 397060、WO 98/11105、WO 98/11103、WO 98/11102、WO 98/04552、WO 98/04551、DE 4243321、DE 4005970、DE 4217964、DE 4005970、DE 3914764、WO 96/04906、WO 95/07910、DE 42179464、US 5856517、US 5891901、WO 99/42100、EP 328026、EP 384349、EP 540956、DE 4005969、EP 508792等に記載の方法またはそれらに準じた方法により製造することができる。

【0067】

2. GSK-3の活性を阻害する物質の探索法

GSK-3の活性を阻害する物質の探索法は、[i] 被験物質の存在下、GSK-3、GSK-3によりリン酸化されるペプチドおよびATPを共存させた場合と、[ii] 被験物質の非存在下、上記[i]のGSK-3、GSK-3によりリン酸化されるペプチドおよびATPを共存させた場合での、[iii] リン酸化されているペプチドの量を測定、比較し、[iv] 被験物質の非存在下に比べ、被験物質の存在下におけるリン酸化されているペプチドの量が少ない物質を選択す

る方法をあげることができる。

【0068】

被験物質は、特に限定されないが、例えば、ペプチド、蛋白質、細胞抽出液や該抽出液由来の精製物、細胞培養上清や該上清由来の精製物、血清などの生体試料や該生体試料由来の精製物、微生物の菌体抽出液や該抽出液由来の精製物、微生物培養上清や該上清由来の精製物、化合物、コンビナトリアルケミストリーを用いて合成された化合物などをあげることができる。

【0069】

GSK-3 としては、GSK-3 の活性を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来の GSK-3 α または β をあげることができ、具体的には配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

GSK-3 は、GSK-3 をコードする遺伝子を有する発現ベクターを動物細胞に導入し、該動物細胞を培養する方法などにより取得することができる。GSK-3 をコードする遺伝子は、GSK-3 をコードする遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来の GSK-3 α または β をコードする遺伝子をあげることができ、具体的には配列番号 2 で表される塩基配列を有する遺伝子をあげることができる。

【0070】

GSK-3 によりリン酸化されるペプチドとしては、グリコーゲン合成酵素をあげることができ、グリコーゲン合成酵素としては、例えば配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

グリコーゲン合成酵素は、グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子を有する発現ベクターを動物細胞に導入し、該動物細胞を培養する方法などにより取得することができる。グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子は、グリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくはほ乳類、より好ましくはラット、マウス、サルまたはヒト由来のグリコーゲン合成酵素をコードする遺伝子をあげることができ、具体的には配列番号 4 で表される塩基配列を有する遺伝子をあげることができる。

【0071】

また、蛋白質の翻訳に関与するeukaryotic initiation factor 2B (eIF2B) 蛋白質のアミノ酸配列中で、GSK-3によりリン酸化される部位を含むアミノ酸配列を有するペプチドもGSK-3によりリン酸化されるペプチドとして用いることができ、具体的には配列番号5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。

【0072】

GSK-3の活性を測定する方法としては、例えばリン酸の供与体であるATPとして $[\gamma-^{33}\text{P}]$ ATPを用い、被験物質存在下、または被験物質非存在下において、GSK-3によるグリコーゲン合成酵素または該酵素のリン酸化部位を含むペプチドのリン酸化反応を行い、該酵素またはペプチドに取り込まれた ^{33}P の量を液体シンチレーションカウンターなどを用いて測定する方法をあげることができる。

【0073】

3. 神経再生薬

神経再生薬とは、ヒトまたは動物の脳内の神経幹細胞に直接作用することでニューロン新生を促進し、脳内のニューロンを増加させる作用を有する薬剤をいう。

【0074】

該神経再生薬は、神経の変性または損傷を伴う神経疾患の治療薬として用いることができる。

該神経疾患としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳血管障害、脊髄損傷、ハンチントン舞蹈病、うつ病および躁鬱病などをあげることができる。

GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩は、神経再生薬として、そのまま単独で投与することも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用されるものである。

【0075】

本発明の神経再生薬は、活性成分としてGSK-3の活性を阻害する物質また

はその薬理学的に許容される塩を単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。また、それら医薬製剤は、活性成分を薬理学的に許容される一種もしくはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られている任意の方法により製造される。

【0076】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口または、例えば静脈内などの非経口をあげることができる。

投与形態としては、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、注射剤などがある。

経口投与に適当な、例えばシロップ剤のような液体調製物は、水、蔗糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを使用して製造できる。また、錠剤、散剤および顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。

【0077】

非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性剤からなる。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体などを用いて注射用の溶液を調製する。

また、これら非経口剤においても、経口剤で例示した希釈剤、防腐剤、フレーバー類、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

【0078】

GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩の投与量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度により異なるが、通常経口の場合、成人一人当たり0.01mg~1g、好ましく

は0.05～50mgを一日一回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、成人一人当たり0.001～100mg、好ましくは0.01～10mgを一日一回ないし数回投与する。

【0079】

4. 神経幹細胞のニューロン新生促進剤

神経幹細胞のニューロン新生促進剤とは、in vivoまたはin vitroにおいて、神経幹細胞と接触させたとき、該神経幹細胞のニューロン新生を促進する薬剤のことをいう。

【0080】

神経幹細胞は、神経幹細胞であれば特に限定されないが、脳の成体神経幹細胞が好ましい。

脳は、いずれの動物の脳であってもよいが、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット、マウス、サル、ヒトなどの脳をあげることができる。

GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤として、そのまま単独で用いることも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが望ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用されるものである。

【0081】

本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤は、活性成分としてGSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩を単独で、あるいは任意の他の治療のための有効成分との混合物として含有することができる。それら医薬製剤は、上記した神経再生薬の製剤と同様の方法により製造することができ、同様の投与方法により投与することができる。

【0082】

本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤は、in vitroにおいて、神経幹細胞と接触させ、該神経細胞を培養することにより、ニューロンを新生させ、培養物から該ニューロンを採取することを特徴とするニューロンの製造法に用いることができる。in vitroで本発明の神経幹細胞のニューロン新生促進剤を用いる場合、GSK-3の活性を阻害する物質またはその薬理学的に許容される塩を、該

物質または該塩を溶解することができる溶液に溶解して用いることが好ましい。
該溶液としては、水、DMSOなどをあげることができる。

【0083】

5. 本発明のニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロン

本発明のニューロン新生促進剤の存在下、動物の神経幹細胞を培養することにより、該神経幹細胞のニューロン新生を積極的に促進させることができる。動物の神経幹細胞は、いずれの動物の神経幹細胞であってもよく、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラット、マウス、サル、ヒト由来の神経幹細胞をあげることができる。神経幹細胞としては、脳由来の神経幹細胞をあげることができる。神経幹細胞は、いずれの週齢、または年齢の動物由来の細胞でもよいが、本発明のニューロン新生促進剤は、成体神経幹細胞のニューロン新生を促進させることができる。

【0084】

動物からの成体神経幹細胞の取得する方法としては、J. Neurosci., 19, 8487 (1999)およびGenes & Develop., 10, 3129 (1996)記載の方法に準じて、外科的手法によって成体動物から脳を摘出して、脳細胞粗抽出液を調製し、該粗抽出液から成体幹細胞を濃縮する方法をあげることができる。

本発明のニューロン新生促進剤存在下、成体神経幹細胞を培養する場合、 1.8×10^5 個/cm²程度の成体神経幹細胞に対して、該ニューロン新生促進剤を100nmol/l～100 μ mol/lの濃度で作用させることが好ましい。ただし、リチウムまたはその薬理学的に許容される塩は100 μ mol/l～10mmol/lの濃度で作用させることが好ましい。成体神経幹細胞と本発明のニューロン新生促進剤を接触させ、37℃で5%CO₂雰囲気下、4～14日間、2日おきに全量または部分量培地交換しながら静置培養することでニューロン新生を促進させることができる。

【0085】

成体神経幹細胞の培養に用いる培地は、ニューロン新生の促進を妨げない培地であればいずれの培地でもよいが、1%のN2 supplement (Invitrogen社製)を含むDMEM/F12培地 (Invitrogen社製) などを用いるのが好ましい。

上記の培養により取得されるニューロンは、培地から回収し、神経疾患患者の障害部位へ外科的手法で移植することにより該神経疾患の治療に用いることができる。該神経疾患としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳血管障害、脊髄損傷、ハンチントン舞踏病、うつ病および躁鬱病などをあげることができる。

【0086】

6. 本発明の神経再生薬の評価法

本発明の神経再生薬が、*in vivo*においてニューロンを再生させ、神経疾患を治療することができることは、以下の方法により確認することができる。

【0087】

上記した本発明の神経再生薬を、ラットまたはサルなどの実験動物に投与する。実験動物は、傷害を有していない健康な動物であってもよいが、海馬虚血傷害を与えることによりニューロン新生を効果的に観察することができるので [Cell, 110, 429 (2002)]、虚血、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 投与またはカイニン酸投与等の方法により、脳に傷害を与えた動物が好ましい。投与経路としては、経口、口腔内、皮下、筋肉内、静脈内または脳室内などへの投与をあげることができる。投与量、投与方法としては、例えば体重1kg当り100 μ g~10mg、好ましくは500 μ g~500ngを一日一回ないし数回投与する。静脈内投与などの非経口投与の場合、体重1kg当り10 μ g~1mg、好ましくは100 μ g~100ngを一日一回ないし数回投与する。

【0088】

新生したニューロンは以下の方法により検出することができる。

増殖細胞を標識することができるプロモデオキシウリジン (BrdU)、またはGreen Fluorescent Protein (GFP) やベータガラクトシダーゼ等の細胞標識可能な遺伝子を発現できるレトロウイルスベクターを該物質の最初の投与と同時に、投与前または投与後に該実験動物に投与した後、該物質を一日一回ないし数回投与して10~20日間飼育する。その後、該実験動物の脳を摘出し、脳の凍結切片を調製して蛍光顕微鏡を用いて観察し、例えば増殖細胞を標識する薬剤としてBrdUを用いた場合は、単位面積当たりのBrdU陽性細胞数およびBrdU陽性細胞数に対するニュー

ーロンマーカーであるTuj1陽性細胞数の割合を、陰性コントロールと比較する。

【0089】

以上の方法により、本発明の神経再生薬のニューロン新生促進作用および神経疾患治療効果を評価することができる。

【0090】

7. 本発明のニューロン新生促進剤の評価法

参考例2記載の方法で取得できるANSC-7細胞を、1mlの1%のN2 supplement (Invitrogen社製)と20 ng/mlのFGF-2 (PeproTech社製)を含むDMEM/F12培地が入ったポリオルニチンおよびラミニンでコートした12穴培養ディッシュに1穴当たり 1.8×10^5 個まき、一晚インキュベートする。培養液を、FGF2を含まず0.5%の胎仔牛血清及び1%のN2supplementを含むDMEM/F12培地 (Invitrogen社製。以下、分化誘導培地と称する) に全量交換して分化を誘導する。その際、PBS (Invitrogen社製) またはDMSOで0.01mmol/l～5mol/lの範囲で段階的に希釈したGSK-3の活性を阻害する物質をそれぞれ1000分の1容量添加する。陰性コントロールとして同容量のPBSまたはDMSOを添加する。

【0091】

培養液を、それぞれのGSK-3の活性を阻害する物質が入った分化誘導培地で2日おきに交換し、計6日間分化誘導後、15%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) に置換し20分間固定する。その後、0.3% TritonX-100 (ナカライテスク社製) を含むPBSを用いた5分間の洗浄を3回繰り返す。次に、PBSで希釈した10%ヤギ胎児血清 (DAKO社製) を用いて細胞を2時間ブロッキングした後、1次抗体としてPBSで1000倍希釈したマウス抗Tuj1 (β チューブリンイソタイプIII) 抗体 (シグマ アルドリッチ社製) を4℃で16時間反応させる。その後、0.3% TritonX-1

00を含むPBSを用いた5分間の洗浄を3回繰り返す。

【0092】

次に、2次抗体として1000倍希釈したAlexa Fluor 488コンジュゲートヤギ抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes社製) を室温で2時間反応させる。同時にBisbenzimidide H 33342 Fluorochrome, Trihydrochloride (Calbiochem社製、以下H33342

と記す) を終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、核を染色する。PBSに浸したのち倒立型蛍光顕微鏡(ニコン)により観察し、2.44平方ミリメートルあたりのTuj1陽性ニューロン数をカウントする。

【0093】

以下、GSK-3の活性を阻害する物質として、リチウムを用いた場合の実験例を示す。

【0094】

実験例1：塩化リチウムによるニューロン新生促進(1)

上記7の方法により、ANSC-7細胞の分化誘導時にPBSで0.01, 0.1, 1, 3mmol/lになるように溶解した塩化リチウムあるいは塩化ナトリウム(いずれもナカライテスク社製)を培養液の1000分の1容量、ANSC-7細胞を含有する培地に添加し、分化誘導後6日目のニューロン数を解析した。その結果、Tuj1陽性のニューロン数は塩化リチウム濃度に依存して増加した。また3mmol/lの塩化リチウムによるH33342陽性の総細胞数は塩化リチウムなしのコントロールと比較して差がなかった。以上のことから、塩化リチウムはANSC-7細胞のニューロン新生促進作用を有することが明らかとなった。また、ネガティブコントロールである塩化ナトリウムによってニューロン数は増加しなかったため、ニューロン新生数の増加は塩濃度や塩化物イオンによる効果ではなくリチウムの効果であると考えられる。

【0095】

実験例2：塩化リチウムによるニューロン新生促進(2)

ANSC-7細胞に対するニューロン新生促進作用がBDNFおよびBcl-2の発現誘導によるものであるかを明らかにするため、リチウムによりBDNFおよびBcl-2の発現が促進されるか否かを半定量的RT-PCRにより解析した。

【0096】

ANSC-7細胞を、2mlの1%のN2 supplementと20 ng/mlのFGF-2を含むDMEM/F12培地が入ったポリオルニチンとラミニンでコートした6穴培養ディッシュに、1穴あたり 4.5×10^5 個になるように計7穴まき、一晚インキュベートした。1穴の細胞からRNeasy mini kit(キアゲン社製)を用いて添付プロトコールに従って全RNAを取得した。残り6穴の培地を分化誘導培地に全量交換して分化を誘導した。その

うち2穴には3mol/lの塩化リチウムを培地の1000分の1容量、別の2穴には1mol/lの塩化リチウムを培地の1000分の1容量添加した。残り2穴には同容量のPBSを添加しコントロールとした。

【0097】

分化誘導開始から24時間後、各濃度の塩化リチウムを添加した1穴ずつから細胞を採取し、該細胞から上記と同様の方法により全RNAを取得し、残りの細胞からは分化誘導開始から6日後に全RNAを取得した。上記で取得した各5 μ gの全RNAに、10 μ lの5 \times DNase buffer、0.5 μ lのRNase inhibitor(40U/ μ l)、2.5 μ lのRNase-free DNaseI(1U/ μ l)(以上プロメガ社製)をそれぞれ加え、滅菌水で総容量を50 μ lとした。37℃で30分間反応させた後、フェノール/クロロホルム処理したのちエタノール沈殿した。

【0098】

DNase処理した各1 μ gの全RNAに0.5 μ g/ μ lオリゴ(dT)12-18プライマーを1 μ l加え、滅菌水で総容量を12 μ lとした。65℃で10分間加熱した後氷上で急冷し、4 μ lの5 \times synthesis buffer(インビトロジェン社製)、1 μ lの10mmol/l dNTP mix、2 μ lの0.1mol/l DTT、1 μ lの200U/ μ l SuperscriptII RT(インビトロジェン社製)を加え、42℃で50分間反応した。

90℃で5分間加熱した後氷上に10分間置いた。

【0099】

次にRNaseH(2U/ μ l)(インビトロジェン社製)を1 μ l加え、37℃で20分間反応し、滅菌水を加えて総容量を200 μ lとすることによりcDNAを作製した。

同様に陽性コントロール用としてラット脳の全RNAからcDNAを作成した。1 μ lの該cDNAに、2 μ lの10 μ mol/l プライマーセット、1 μ lのDMSO(ナカライテスク社製)、2 μ lの10 \times ExTaq buffer、1.6 μ lのdNTPmix、0.1 μ lのExTaq(以上、タカラバイオ社製)を加え、サーマルサイクラーを用いて94℃で1分間処理後、94℃で1分間、60℃で1分間、74℃で1分間のサイクルを、Bcl-2増幅用PCRで27サイクル、BDNF増幅用PCRで35サイクル繰り返し、それぞれのcDNA断片を増幅させた。Bcl-2の増幅には配列番号6および7で表される塩基配列からなる合成DNAを、BDNFの増幅には配列番号8および9で表される塩基配列からなる合成DNAをプラ

イマーセットに用いた。

【0100】

増幅DNAは、1.8% アガロース（ナカライテスク社製）ゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド（ナカライテスク社製）で染色後、トランスイルミネーター（東洋紡社製）で検出した。Bcl-2のバンド強度は分化開始後24時間目および6日目ともに塩化リチウムの濃度差により変化しなかった。BDNFは塩化リチウムの濃度差に関わらず発現は認められなかった。

【0101】

以上の結果から、塩化リチウムによるニューロン新生促進活性は、Bcl-2およびBDNFを介した細胞死抑制の結果ではなく、塩化リチウムは積極的にニューロン新生を促進することが示唆された。

【0102】

実験例3：塩化リチウムによるニューロン新生促進（3）

リチウムによるニューロン新生促進作用がアポトーシス抑制による新生細胞数の増加であるのか、あるいは積極的にニューロン分化を誘導しているのかを明らかにするため、リチウムによるANSC-7細胞に対するアポトーシス抑制効果を解析した。

【0103】

上記7の方法により、塩化リチウムを終濃度3mmol/lになるようにANSC-7細胞を含有する培地に添加して6日間培養し、塩化リチウムを添加して培養したANSC-7細胞とコントロールとしてPBSを添加して培養したANSC-7細胞とを、in situ細胞死検出キット、フルオレセイン（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）を用いて添付プロトコールどおり該細胞と反応させた。倒立型蛍光顕微鏡（ニコン社製）を用いて該細胞を観察し、2.44平方ミリメートルあたりのアポトーシス細胞数をカウントした。

【0104】

その結果、アポトーシス陽性細胞数は塩化リチウム添加により変化せず、塩化リチウムはANSC-7細胞のアポトーシスを抑制しないことが明らかとなった。従って、リチウムによるニューロン新生促進は、積極的なニューロン新生の促進であ

ることが明らかとなった。

【0105】

実験例4：インスリンおよびフォルスコリンとリチウムとのニューロン新生促進作用に関する拮抗作用

ニューロン新生促進作用が知られるインスリンおよびフォルスコリンとリチウムとのニューロン新生促進作用に関する拮抗作用を解析した。

【0106】

上記7の方法により、ANSC-7細胞の分化誘導時に、培地中の濃度が $5\mu\text{g/ml}$ または $25\mu\text{g/ml}$ になるようにインスリンを培地に添加するとともに、各濃度のインスリンを含む培地に、終濃度が0、1および 3mmol/l になるように塩化リチウムを添加し、6日間分化誘導を行った。

その結果、 3mmol/l の塩化リチウムによるニューロン増加率は、 $5\mu\text{g/ml}$ のインスリン共存時に比べ、 $25\mu\text{g/ml}$ のインスリン共存時で有意に低下していた。よって、インスリンとリチウムの作用が拮抗することが明らかとなった。

【0107】

また、上記と同様の方法にて、インスリンの代わりに終濃度が0、1および $5\mu\text{mol/l}$ になるようにフォルスコリンを培地に添加し、終濃度が0または 3mmol/l の塩化リチウム共存時におけるニューロン増加率を算出した。

その結果、塩化リチウムとフォルスコリンによるニューロン増加率が互いに加算しなかった。従って、塩化リチウムとフォルスコリンは、ニューロン新生促進作用において拮抗することが明らかとなった。

【0108】

リチウムの標的分子としては、GSK-3やイノシトール-1-リン酸フォスファターゼやイノシトールポリフォスファターゼが知られており [Nature, 417, 292-295(2002)]、また、インスリンとフォルスコリンは間接にGSK-3の活性を阻害することが知られている [Mol. Cell. Biol., 19, 4989-5000(1999)]。リチウム、インスリンおよびフォルスコリンのニューロン新生促進作用に関する標的分子は共通であると考えられることから、リチウムはGSK-3の活性を阻害することにより神経幹細胞のニューロン新生を促進していることが示された

【0109】

実験例 5 : GSK-3 の選択的阻害剤である SB-216763 によるニューロン新生促進

参考例 1 記載の方法により合成した GSK-3 の選択的阻害剤として知られる SB-216763 [Chem. Biol., 7, 793-803(2000)] を、0.1 および 0.33 mmol/l になるように DMSO に溶解し、上記 7 の方法により、その 1000 分の 3 容量を ANSC-7 を含有する培地に、ANSC-7 細胞分化誘導時に添加し、分化誘導後 6 日目のニューロン数を測定した。

【0110】

その結果、Tuj1 陽性のニューロン数は SB-216763 濃度依存的に増加した。よって、GSK-3 を選択的に阻害する活性を持つ化合物によりニューロン新生を促進できることが明らかとなった。

以上より、GSK-3 を選択的に阻害する活性を持つ物質は、神経幹細胞のニューロン新生促進剤になるとともに、神経の再生治療薬になることが示された。

【0111】

参考例 1 : 3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチルインドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン (SB-216763) の合成

工程 1 : 3-インドールグリオキシル酸メチルエステルの合成

市販の 3-インドールグリオキシル酸 (9.55 g) を塩化メチレン (300 mL) に懸濁し、氷冷下、オキサリルクロリド (8.8 mL) を加え、20℃ で 20 時間攪拌した。反応液を氷冷し、メタノール (190 mL) を加えた後、反応液を 25℃ で 1 時間攪拌した。反応液に水および塩化メチレンを加え、析出した結晶を濾取し、結晶を塩化メチレンで洗浄した。結晶を減圧乾燥し、3-インドールグリオキシル酸メチルエステル (7.07 g, 69%) を得た。

【0112】

工程 2 : 2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステルの合成

工程 1 で得られた 3-インドールグリオキシル酸メチルエステル (5.88 g) を

N, N-ジメチルホルムアミド (180 mL) に溶解し、0℃で攪拌しながら、水素化ナトリウム (60%オイル分散、1.4 g) を少量ずつ加えた。反応混合物を1時間攪拌した後、ヨウ化メチル (1.2 mL) を加え、20℃で20時間攪拌した。氷冷水を反応液に添加した後、1 mol/L 塩酸でpH値を5に調整した。析出した結晶を濾取し、水で洗浄した。結晶を減圧乾燥し、2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステル (1.96 g、33%) を得た。

【0113】

工程3: 2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド

市販の2, 4-ジクロロフェニル酢酸 (12.4 g) を塩化メチレン (350 mL) に溶解し、氷冷下、オキサリルクロリド (10.6 mL) を加え、20℃で20時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を塩化メチレン (100 mL) に溶解した。この溶液を氷冷した28%アンモニア水溶液 (250 mL) に滴下し、塩化メチレンを減圧留去した。析出した結晶を濾取し、水で洗浄した。結晶を減圧乾燥し、2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド (11.14 g、90%) を得た。

【0114】

工程4: SB-216763の合成

tert-ブトキシカリウム (0.5 g) をテトラヒドロフラン (35 mL) に溶解し、氷冷下、工程2で得られた2-(1-メチルインドール-3-イル)-2-オキソ酢酸メチルエステル (0.4 g)、次いで工程3で得られた2, 4-ジクロロフェニル酢酸アミド (0.3 g) を加え、同温度で3時間攪拌した。水を反応液に添加した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、結晶をエタノールで洗浄した。結晶を減圧乾燥し、SB-216763 (390 mg、70%) を得た。

【0115】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 3.89(s, 3H), 6.41(d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.80(t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.15(t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.32-7.38(m, 3H), 7.49(s, 1H), 8.01(s, 1H), 10.94(s, 1H)

元素分析: 理論値 (C: 61.5、H: 3.3、N: 7.6)、測定値 (C: 61.3、H: 3.5、N: 7.4)

【0116】

参考例2：ラット脳からの成体神経幹細胞の単離と培養

7週齢のSprague Dawley ratをエーテル麻酔によって眠らせた後に断頭し、頭頂部より頭蓋骨を切開して脳を摘出した。摘出した脳から脳室周囲部位を含む組織を顕微鏡下で眼科用のはさみとピンセットを用いて分離した。脳室周囲部位を含む組織は眼科用はさみとメスを用いて 1mm^3 程度の断片にした後、 2.5U/ml のパパイン、 250U/ml のDNase（いずれもWorthington, Freehold, NJ社製）、 1u/ml の中性プロテアーゼ（Dispase：Boehringer Mannheim社製）を含む 5ml のHBSS緩衝液（Invitrogen社製）中で 37°C 、30分間消化反応を行なった。該反応により得られた細胞と組織の混合物を10%の胎仔牛血清（Hyclone社製）を含むDMEM（Invitrogen社製）で3回洗浄後、10%の胎仔牛血清を含むDMEMに溶解し、 $10^7\mu\text{m}$ のナイロンメッシュを用いて未消化物を除去した。

【0117】

得られた細胞粗抽出液を、 10cm の培養皿上で10%の胎仔牛血清を含むDMEM/F12培地（Invitrogen社製）を用いて 37°C のインキュベーター中で1晩培養した。翌日、培地を1%のN2 supplement（Invitrogen社製）と 20ng/ml のFGF-2（PeproTech社製）を含むDMEM/F12に置換して培養を開始した。3日に一度、培地の半分を新しい1%のN2 supplementと 20 ng/ml のFGF-2を含むDMEM/F12に置換し、培養を継続した。小型細胞の小さなコロニーが形成されたら1%のトリプシンで30秒から1分間程度処理し、剥がれた細胞を回収した。該細胞は、 $10\mu\text{g/ml}$ のポリオルニチン（シグマ社製）を用いて室温で一晩、および $5\mu\text{g/ml}$ のマウスEHS腫瘍由来ラミニン（Becton Dickinson社製）を用いて 37°C で一晩コートしたマルチ・ウエルの培養皿（Fisher Scientific社製）上に撒き、培養を継続した。上記培養を続けることで、小型の突起を有し、厚みのある小型細胞が濃縮された。本細胞を成体神経幹細胞株ANSC-7として上記の実験に使用した。

【0118】

【実施例】

実施例1：錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

処方	SB-216763	5mg
	乳糖	62mg
	馬鈴薯デンプン	30mg
	ポリビニルアルコール	2mg
	<u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>1mg</u>
		100mg

【0119】

実施例2：神経幹細胞のニューロン新生促進剤（1）

常法により、塩化リチウムを3mol/lになるようにPBSに溶解し、塩化リチウムを含む神経幹細胞のニューロン新生促進剤を調製した。

【0120】

実施例3：神経幹細胞のニューロン新生促進剤（2）

常法により、SB-216763を0.1mmol/lになるようにDMSOに溶解し、SB-216763を含む神経幹細胞のニューロン新生促進剤を調製した。

【0121】

【発明の効果】

本発明によれば、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、該物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供することができる。

【0122】

【配列表フリーテキスト】

配列番号5－人工配列の説明：合成蛋白質

配列番号6－人工配列の説明：合成DNA

配列番号7－人工配列の説明：合成DNA

配列番号8－人工配列の説明：合成DNA

配列番号9－人工配列の説明：合成DNA

【 0 1 2 3 】

【配列表】

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120>

<130> H15-0071A4

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 420

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro

1

5

10

15

Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys

20

25

30

Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro

35

40

45

Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn

50

55

60

Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu
65 70 75 80

Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg
85 90 95

Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu
100 105 110

Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu
115 120 125

Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg
130 135 140

His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu
145 150 155 160

Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly
165 170 175

Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp
180 185 190

Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val
195 200 205

Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala

210	215	220
Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val		
225	230	235 240
Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile		
	245	250 255
Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val		
	260	265 270
Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr		
	275	280 285
Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val		
	290	295 300
Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu		
305	310	315 320
Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala		
	325	330 335
His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn		
	340	345 350
Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser		
	355	360 365

Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
 370 375 380

Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala
 385 390 395 400

Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala
 405 410 415

Ser Asn Ser Thr
 420

<210> 2

<211> 1260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atg tca ggg cgg ccc aga acc acc tcc ttt gcg gag agc tgc aag ccg 48
 Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala Glu Ser Cys Lys Pro
 1 5 10 15

gtg cag cag cct tca gct ttt ggc agc atg aaa gtt agc aga gac aag 96
 Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys Val Ser Arg Asp Lys
 20 25 30

gac ggc agc aag gtg aca aca gtg gtg gca act cct ggg cag ggt cca 144
 Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro

35	40	45	
gac agg cca caa gaa gtc agc tat aca gac act aaa gtg att gga aat			192
Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Lys Val Ile Gly Asn			
50	55	60	
gga tca ttt ggt gtg gta tat caa gcc aaa ctt tgt gat tca gga gaa			240
Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu Cys Asp Ser Gly Glu			
65	70	75	80
ctg gtc gcc atc aag aaa gta ttg cag gac aag aga ttt aag aat cga			288
Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys Arg Phe Lys Asn Arg			
85	90	95	
gag ctc cag atc atg aga aag cta gat cac tgt aac ata gtc cga ttg			336
Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys Asn Ile Val Arg Leu			
100	105	110	
cgt tat ttc ttc tac tcc agt ggt gag aag aaa gat gag gtc tat ctt			384
Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys Asp Glu Val Tyr Leu			
115	120	125	
aat ctg gtg ctg gac tat gtt ccg gaa aca gta tac aga gtt gcc aga			432
Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val Tyr Arg Val Ala Arg			
130	135	140	
cac tat agt cga gcc aaa cag acg ctc cct gtg att tat gtc aag ttg			480
His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Lys Leu			
145	150	155	160

tat atg tat cag ctg ttc cga agt tta gcc tat atc cat tcc ttt gga 528

Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr Ile His Ser Phe Gly

165

170

175

atc tgc cat cgg gat att aaa ccg cag aac ctc ttg ttg gat cct gat 576

Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu Leu Leu Asp Pro Asp

180

185

190

act gct gta tta aaa ctc tgt gac ttt gga agt gca aag cag ctg gtc 624

Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser Ala Lys Gln Leu Val

195

200

205

cga gga gaa ccc aat gtt tcg tat atc tgt tct cgg tac tat agg gca 672

Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala

210

215

220

cca gag ttg atc ttt gga gcc act gat tat acc tct agt ata gat gta 720

Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr Ser Ser Ile Asp Val

225

230

235

240

tgg tct gct ggc tgt gtg ttg gct gag ctg tta cta gga caa cca ata 768

Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile

245

250

255

ttt cca ggg gat agt ggt gtg gat cag ttg gta gaa ata atc aag gtc 816

Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val

260

265

270

ctg gga act cca aca agg gag caa atc aga gaa atg aac cca aac tac 864
Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu Met Asn Pro Asn Tyr
275 280 285

aca gaa ttt aaa ttc cct caa att aag gca cat cct tgg act aag gtc 912
Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His Pro Trp Thr Lys Val
290 295 300

ttc cga ccc cga act cca ccg gag gca att gca ctg tgt agc cgt ctg 960
Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Cys Ser Arg Leu
305 310 315 320

ctg gag tat aca cca act gcc cga cta aca cca ctg gaa gct tgt gca 1008
Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro Leu Glu Ala Cys Ala
325 330 335

cat tca ttt ttt gat gaa tta cgg gac cca aat gtc aaa cat cca aat 1056
His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn Val Lys His Pro Asn
340 345 350

ggg cga gac aca cct gca ctc ttc aac ttc acc act caa gaa ctg tca 1104
Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu Leu Ser
355 360 365

agt aat cca cct ctg gct acc atc ctt att cct cct cat gct cgg att 1152
Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro Pro His Ala Arg Ile
370 375 380

caa gca gct gct tca acc ccc aca aat gcc aca gca gcg tca gat gct 1200

Gln Ala Ala Ala Ser Thr Pro Thr Asn Ala Thr Ala Ala Ser Asp Ala
 385 390 395 400

aat act gga gac cgt gga cag acc aat aat gct gct tct gca tca gct 1248
 Asn Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala Ala Ser Ala Ser Ala
 405 410 415

tcc aac tcc acc 1260
 Ser Asn Ser Thr
 420

<210> 3

<211> 737

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Pro Leu Asn Arg Thr Leu Ser Met Ser Ser Leu Pro Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Asp Trp Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Leu Phe Glu Val
 20 25 30

Ala Trp Glu Val Ala Asn Lys Val Gly Gly Ile Tyr Thr Val Leu Gln
 35 40 45

Thr Lys Ala Lys Val Thr Gly Asp Glu Trp Gly Asp Asn Tyr Phe Leu
 50 55 60

Val Gly Pro Tyr Thr Glu Gln Gly Val Arg Thr Gln Val Glu Leu Leu
65 70 75 80

Glu Ala Pro Thr Pro Ala Leu Lys Arg Thr Leu Asp Ser Met Asn Ser
85 90 95

Lys Gly Cys Lys Val Tyr Phe Gly Arg Trp Leu Ile Glu Gly Gly Pro
100 105 110

Leu Val Val Leu Leu Asp Val Gly Ala Ser Ala Trp Ala Leu Glu Arg
115 120 125

Trp Lys Gly Glu Leu Trp Asp Ile Cys Asn Ile Gly Val Pro Trp Tyr
130 135 140

Asp Arg Glu Ala Asn Asp Ala Val Leu Phe Gly Phe Leu Thr Thr Trp
145 150 155 160

Phe Leu Gly Glu Phe Leu Ala Gln Ser Glu Glu Lys Pro His Val Val
165 170 175

Ala His Phe His Glu Trp Leu Ala Gly Val Gly Leu Cys Leu Cys Arg
180 185 190

Ala Arg Arg Leu Pro Val Ala Thr Ile Phe Thr Thr His Ala Thr Leu
195 200 205

Leu Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Val Asp Phe Tyr Asn Asn Leu

210 215 220

Glu Asn Phe Asn Val Asp Lys Glu Ala Gly Glu Arg Gln Ile Tyr His
225 230 235 240

Arg Tyr Cys Met Glu Arg Ala Ala Ala His Cys Ala His Val Phe Thr
245 250 255

Thr Val Ser Gln Ile Thr Ala Ile Glu Ala Gln His Leu Leu Lys Arg
260 265 270

Lys Pro Asp Ile Val Thr Pro Asn Gly Leu Asn Val Lys Lys Phe Ser
275 280 285

Ala Met His Glu Phe Gln Asn Leu His Ala Gln Ser Lys Ala Arg Ile
290 295 300

Gln Glu Phe Val Arg Gly His Phe Tyr Gly His Leu Asp Phe Asn Leu
305 310 315 320

Asp Lys Thr Leu Tyr Phe Phe Ile Ala Gly Arg Tyr Glu Phe Ser Asn
325 330 335

Lys Gly Ala Asp Val Phe Leu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Asn Tyr Leu
340 345 350

Leu Arg Val Asn Gly Ser Glu Gln Thr Val Val Ala Phe Phe Ile Met
355 360 365

Pro Ala Arg Thr Asn Asn Phe Asn Val Glu Thr Leu Lys Gly Gln Ala
370 375 380

Val Arg Lys Gln Leu Trp Asp Thr Ala Asn Thr Val Lys Glu Lys Phe
385 390 395 400

Gly Arg Lys Leu Tyr Glu Ser Leu Leu Val Gly Ser Leu Pro Asp Met
405 410 415

Asn Lys Met Leu Asp Lys Glu Asp Phe Thr Met Met Lys Arg Ala Ile
420 425 430

Phe Ala Thr Gln Arg Gln Ser Phe Pro Pro Val Cys Thr His Asn Met
435 440 445

Leu Asp Asp Ser Ser Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ile Arg Arg Ile Gly
450 455 460

Leu Phe Asn Ser Ser Ala Asp Arg Val Lys Val Ile Phe His Pro Glu
465 470 475 480

Phe Leu Ser Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Asp Tyr Glu Glu Phe
485 490 495

Val Arg Gly Cys His Leu Gly Val Phe Pro Ser Tyr Tyr Glu Pro Trp
500 505 510

Gly Tyr Thr Pro Ala Glu Cys Thr Val Met Gly Ile Pro Ser Ile Ser
515 520 525

Thr Asn Leu Ser Gly Phe Gly Cys Phe Met Glu Glu His Ile Ala Asp
530 535 540

Pro Ser Ala Tyr Gly Ile Tyr Ile Leu Asp Arg Arg Phe Arg Ser Leu
545 550 555 560

Asp Asp Ser Cys Ser Gln Leu Thr Ser Phe Leu Tyr Ser Phe Cys Gln
565 570 575

Gln Ser Arg Arg Gln Arg Ile Ile Gln Arg Asn Arg Thr Glu Arg Leu
580 585 590

Ser Asp Leu Leu Asp Trp Lys Tyr Leu Gly Arg Tyr Tyr Met Ser Ala
595 600 605

Arg His Met Ala Leu Ser Lys Ala Phe Pro Glu His Phe Thr Tyr Glu
610 615 620

Pro Asn Glu Ala Asp Ala Ala Gln Gly Tyr Arg Tyr Pro Arg Pro Ala
625 630 635 640

Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser Ser Pro His Gln
645 650 655

Ser Glu Asp Glu Glu Asp Pro Arg Asn Gly Pro Leu Glu Glu Asp Gly
660 665 670

Glu Arg Tyr Asp Glu Asp Glu Glu Ala Ala Lys Asp Arg Arg Asn Ile

675

680

685

Arg Ala Pro Glu Trp Pro Arg Arg Ala Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser

690

695

700

Gly Arg Lys Arg Asn Ser Val Asp Thr Ala Thr Ser Ser Ser Leu Ser

705

710

715

720

Thr Pro Ser Glu Pro Leu Ser Pro Thr Ser Ser Leu Gly Glu Glu Arg

725

730

735

Asn

<210> 4

<211> 2211

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atg cct tta aac cgc act ttg tcc atg tcc tca ctg cca gga ctg gag 48

Met Pro Leu Asn Arg Thr Leu Ser Met Ser Ser Leu Pro Gly Leu Glu

1

5

10

15

gac tgg gag gat gaa ttc gac ctg gag aac gca gtg ctc ttc gaa gtg 96

Asp Trp Glu Asp Glu Phe Asp Leu Glu Asn Ala Val Leu Phe Glu Val

20

25

30

gcc tgg gag gtg gct aac aag gtg ggt ggc atc tac acg gtg ctg cag 144

Ala Trp Glu Val Ala Asn Lys Val Gly Gly Ile Tyr Thr Val Leu Gln
 35 40 45

acg aag gcg aag gtg aca ggg gac gaa tgg ggc gac aac tac ttc ctg 192
 Thr Lys Ala Lys Val Thr Gly Asp Glu Trp Gly Asp Asn Tyr Phe Leu
 50 55 60

gtg ggg ccg tac acg gag cag ggc gtc agg acc cag gtg gaa ctg ctg 240
 Val Gly Pro Tyr Thr Glu Gln Gly Val Arg Thr Gln Val Glu Leu Leu
 65 70 75 80

gag gcc ccc acc ccg gcc ctg aag agg aca ctg gat tcc atg aac agc 288
 Glu Ala Pro Thr Pro Ala Leu Lys Arg Thr Leu Asp Ser Met Asn Ser
 85 90 95

aag ggc tgc aag gtg tat ttc ggg cgc tgg ctg atc gag gga ggc cct 336
 Lys Gly Cys Lys Val Tyr Phe Gly Arg Trp Leu Ile Glu Gly Gly Pro
 100 105 110

ctg gtg gtg ctc ctg gac gtg ggt gcc tca gct tgg gcc ctg gag cgc 384
 Leu Val Val Leu Leu Asp Val Gly Ala Ser Ala Trp Ala Leu Glu Arg
 115 120 125

tgg aag gga gag ctc tgg gat atc tgc aac atc gga gtg ccg tgg tac 432
 Trp Lys Gly Glu Leu Trp Asp Ile Cys Asn Ile Gly Val Pro Trp Tyr
 130 135 140

gac cgc gag gcc aac gac gct gtc ctc ttt ggc ttt ctg acc acc tgg 480
 Asp Arg Glu Ala Asn Asp Ala Val Leu Phe Gly Phe Leu Thr Thr Trp

145	150	155	160
ttc ctg ggt gag ttc ctg gca cag agt gag gag aag cca cat gtg gtt 528			
Phe Leu Gly Glu Phe Leu Ala Gln Ser Glu Glu Lys Pro His Val Val			
165	170	175	
gct cac ttc cat gag tgg ttg gca ggc gtt gga ctc tgc ctg tgt cgt 576			
Ala His Phe His Glu Trp Leu Ala Gly Val Gly Leu Cys Leu Cys Arg			
180	185	190	
gcc cgg cga ctg cct gta gca acc atc ttc acc acc cat gcc acg ctg 624			
Ala Arg Arg Leu Pro Val Ala Thr Ile Phe Thr Thr His Ala Thr Leu			
195	200	205	
ctg ggg cgc tac ctg tgt gcc ggt gcc gtg gac ttc tac aac aac ctg 672			
Leu Gly Arg Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Val Asp Phe Tyr Asn Asn Leu			
210	215	220	
gag aac ttc aac gtg gac aag gaa gca ggg gag agg cag atc tac cac 720			
Glu Asn Phe Asn Val Asp Lys Glu Ala Gly Glu Arg Gln Ile Tyr His			
225	230	235	240
cga tac tgc atg gaa agg gcg gca gcc cac tgc gct cac gtc ttc act 768			
Arg Tyr Cys Met Glu Arg Ala Ala Ala His Cys Ala His Val Phe Thr			
245	250	255	
act gtg tcc cag atc acc gcc atc gag gca cag cac ttg ctc aag agg 816			
Thr Val Ser Gln Ile Thr Ala Ile Glu Ala Gln His Leu Leu Lys Arg			
260	265	270	

aaa cca gat att gtg acc ccc aat ggg ctg aat gtg aag aag ttt tct 864

Lys Pro Asp Ile Val Thr Pro Asn Gly Leu Asn Val Lys Lys Phe Ser

275

280

285

gcc atg cat gag ttc cag aac ctc cat gct cag agc aag gct cga atc 912

Ala Met His Glu Phe Gln Asn Leu His Ala Gln Ser Lys Ala Arg Ile

290

295

300

cag gag ttt gtg cgg ggc cat ttt tat ggg cat ctg gac ttc aac ttg 960

Gln Glu Phe Val Arg Gly His Phe Tyr Gly His Leu Asp Phe Asn Leu

305

310

315

320

gac aag acc tta tac ttc ttt atc gcc ggc cgc tat gag ttc tcc aac 1008

Asp Lys Thr Leu Tyr Phe Phe Ile Ala Gly Arg Tyr Glu Phe Ser Asn

325

330

335

aag ggt gct gac gtc ttt ctg gag gca ttg gct cgg ctc aac tat ctg 1056

Lys Gly Ala Asp Val Phe Leu Glu Ala Leu Ala Arg Leu Asn Tyr Leu

340

345

350

ctc aga gtg aac ggc agc gag cag aca gtg gtt gcc ttc ttc atc atg 1104

Leu Arg Val Asn Gly Ser Glu Gln Thr Val Val Ala Phe Phe Ile Met

355

360

365

cca gcg cgg acc aac aat ttc aac gtg gaa acc ctc aaa ggc caa gct 1152

Pro Ala Arg Thr Asn Asn Phe Asn Val Glu Thr Leu Lys Gly Gln Ala

370

375

380

gtg cgc aaa cag ctt tgg gac acg gcc aac acg gtg aag gaa aag ttc 1200
Val Arg Lys Gln Leu Trp Asp Thr Ala Asn Thr Val Lys Glu Lys Phe
385 390 395 400

ggg agg aag ctt tat gaa tcc tta ctg gtt ggg agc ctt ccc gac atg 1248
Gly Arg Lys Leu Tyr Glu Ser Leu Leu Val Gly Ser Leu Pro Asp Met
405 410 415

aac aag atg ctg gat aag gaa gac ttc act atg atg aag aga gcc atc 1296
Asn Lys Met Leu Asp Lys Glu Asp Phe Thr Met Met Lys Arg Ala Ile
420 425 430

ttt gca acg cag cgg cag tct ttc ccc cct gtg tgc acc cac aat atg 1344
Phe Ala Thr Gln Arg Gln Ser Phe Pro Pro Val Cys Thr His Asn Met
435 440 445

ctg gat gac tcc tca gac ccc atc ctg acc acc atc cgc cga atc ggc 1392
Leu Asp Asp Ser Ser Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ile Arg Arg Ile Gly
450 455 460

ctc ttc aat agc agt gcc gac agg gtg aag gtg att ttc cac ccg gag 1440
Leu Phe Asn Ser Ser Ala Asp Arg Val Lys Val Ile Phe His Pro Glu
465 470 475 480

ttc ctc tcc tcc aca agc ccc ctg ctc cct gtg gac tat gag gag ttt 1488
Phe Leu Ser Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Asp Tyr Glu Glu Phe
485 490 495

gtc cgt ggc tgt cac ctt gga gtc ttc ccc tcc tac tat gag cct tgg 1536

Val Arg Gly Cys His Leu Gly Val Phe Pro Ser Tyr Tyr Glu Pro Trp

500

505

510

ggc tac aca ccg gct gag tgc acg gtt atg gga atc ccc agt atc tcc 1584

Gly Tyr Thr Pro Ala Glu Cys Thr Val Met Gly Ile Pro Ser Ile Ser

515

520

525

acc aat ctc tcc ggc ttc ggc tgc ttc atg gag gaa cac atc gca gac 1632

Thr Asn Leu Ser Gly Phe Gly Cys Phe Met Glu Glu His Ile Ala Asp

530

535

540

ccc tca gct tac ggt atc tac att ctt gac cgg cgg ttc cgc agc ctg 1680

Pro Ser Ala Tyr Gly Ile Tyr Ile Leu Asp Arg Arg Phe Arg Ser Leu

545

550

555

560

gat gat tcc tgc tcg cag ctc acc tcc ttc ctc tac agt ttc tgt cag 1728

Asp Asp Ser Cys Ser Gln Leu Thr Ser Phe Leu Tyr Ser Phe Cys Gln

565

570

575

cag agc cgg cgg cag cgt atc atc cag cgg aac cgc acg gag cgc ctc 1776

Gln Ser Arg Arg Gln Arg Ile Ile Gln Arg Asn Arg Thr Glu Arg Leu

580

585

590

tcc gac ctt ctg gac tgg aaa tac cta ggc cgg tac tat atg tct gcg 1824

Ser Asp Leu Leu Asp Trp Lys Tyr Leu Gly Arg Tyr Tyr Met Ser Ala

595

600

605

cgc cac atg gcg ctg tcc aag gcc ttt cca gag cac ttc acc tac gag 1872

Arg His Met Ala Leu Ser Lys Ala Phe Pro Glu His Phe Thr Tyr Glu

610	615	620	
ccc aac gag gcg gat gcg gcc cag ggg tac cgc tac cca cgg cca gcc	1920		
Pro Asn Glu Ala Asp Ala Ala Gln Gly Tyr Arg Tyr Pro Arg Pro Ala			
625	630	635	640
tcg gtg cca ccg tcg ccc tcg ctg tca cga cac tcc agc ccg cac cag	1968		
Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser Ser Pro His Gln			
645	650	655	
agt gag gac gag gag gat ccc cgg aac ggg ccg ctg gag gaa gac ggc	2016		
Ser Glu Asp Glu Glu Asp Pro Arg Asn Gly Pro Leu Glu Glu Asp Gly			
660	665	670	
gag cgc tac gat gag gac gag gag gcc gcc aag gac cgg cgc aac atc	2064		
Glu Arg Tyr Asp Glu Asp Glu Glu Ala Ala Lys Asp Arg Arg Asn Ile			
675	680	685	
cgt gca cca gag tgg ccg cgc cga gcg tcc tgc acc tcc tcc acc agc	2112		
Arg Ala Pro Glu Trp Pro Arg Arg Ala Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser			
690	695	700	
ggc cgc aag cgc aac tct gtg gac acg gcc acc tcc agc tca ctc agc	2160		
Gly Arg Lys Arg Asn Ser Val Asp Thr Ala Thr Ser Ser Ser Leu Ser			
705	710	715	720
acc ccg agc gag ccc ctc agc ccc acc agc tcc ctg ggc gag gag cgt	2208		
Thr Pro Ser Glu Pro Leu Ser Pro Thr Ser Ser Leu Gly Glu Glu Arg			
725	730	735	

aac

2211

Asn

<210> 5

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic PRT

<400> 5

Tyr Arg Arg Ala Ala Val Pro Pro Ser Pro Ser Leu Ser Arg His Ser

1

5

10

15

Ser Pro His Gln Ser Glu Asp Glu Glu Glu

2025

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

agggtatgat aaccgggaga tcgt

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

gggcatata gttccacaaa ggca

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

caaaaggcac tggaactcgc aatg

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

ttcttggcaa cggcaacaaa ccac

24

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経再生薬、神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3の活性を阻害する物質を有効成分として含有してなる神経再生薬、該物質を有効成分として含有してなる神経幹細胞のニューロン新生促進剤、該ニューロン新生促進剤の存在下、神経幹細胞を培養して得られるニューロンおよび該ニューロンの製造方法が提供さる。本発明の医薬は、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳血管障害、脊髄損傷、ハンチントン舞蹈病、うつ病、躁鬱病などの神経疾患治療薬として有用である。

【選択図】 なし

特願 2003-114579

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社